

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370002

研究課題名(和文) 超多次元拡張パラメータによる出芽酵母の表現型クラスターの解析

研究課題名(英文) Yeast Phenome analysis with super-hidimensional morphological profiling

## 研究代表者

大矢 禎一 (Ohya, Yoshikazu)

東京大学・新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：20183767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：今まで研究代表者らは出芽酵母の細胞形態を主にして表現型を高次元で定量的に行うことにより、遺伝子欠損による表現型が似ていると遺伝子機能も類似することをゲノム規模で明らかにしてきた。本研究計画ではさらに超多次元の拡張パラメータを作製し、遺伝子産物の局在位置・形態情報を定量化するシステムの構築を行った。さらに高速化した表現型計測システムを導入することで、標的未知の薬剤について、標的予想を行い、形態プロファイリングによる標的予想システムの有用性を実証した。他のモデル生物でも類をみないこの試みは、細胞システム全体を視野に入れた動作原理の理解につながり、多くの研究者や産業界にとって有用な知的資産になる。

研究成果の概要(英文)：The primary goal of automated morphological analysis of subcellular structures using image extraction and quantification is to ensure objectivity and reproducibility. A well-designed experiment followed by appropriate statistical analyses can provide a wealth of biologically meaningful information. With regard to budding yeast, it is essential to quantitatively study the phenotype of numerous sets of mutants to extract genetically and biologically meaningful information. In this study, we addressed some of the biological findings to which quantitative morphological analysis has contributed significantly.

研究分野：分子生物学

キーワード：出芽酵母 表現型解析

## 1. 研究開始当初の背景

出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) は、約 6,000 の比較的少数の遺伝子を持つ真核生物であり、個々の遺伝子の単独破壊株セットが作成されていることから、遺伝子機能欠損と表現型との関係を網羅的に調べるいわゆる Phenome 研究が精力的に行なわれてきた (Warringer J ら(2003)、Brown JA ら(2006)、Hillenmeyer ME ら(2008))。しかしながらこれらの研究は異なる条件下での増殖速度を測定するという単純なものであり、観点は一つに過ぎない。一方研究代表者らは、多くの観点からの観察が可能な顕微鏡での画像情報を対象として選び、形態表現型を 501 もの観点で定量的に数値化できるシステムを構築した (Ohtani M ら(2004))。このシステムではまず出芽酵母細胞の 3 つの染色対象、細胞壁、パッチ状のアクチン細胞骨格、核 DNA を蛍光試薬で染色し、蛍光顕微鏡により 200 個以上の細胞の三重染色像を取得する。その後で細胞形態定量化プログラム CalMorph (カルモルフ) による画像処理を行い、細胞の外形、細胞周期の特定の時期における細胞骨格の配向、細胞中の核の位置関係など、合わせて 501 の観点から細胞周期ステージ別に集計して出力する。この 501 という高次元の定量的な表現型解析を一倍体非必須遺伝子破壊株全 4,718 株で行い、遺伝子産物の機能と表現型との間の関係を明らかにすることを試みた。その結果、950 の遺伝子機能について、同一の細胞機能に関わる遺伝子の破壊株は比較的類似した表現型を示すことを統計的に示し、形態情報の類似性から遺伝子の機能のある程度予測することができることを示した (Ohya Y ら(2005))。その後、研究代表者が中心になって以下の研究成果をおさめてきた。

- ① 表現型分類方法の確立: 複数回(5回)の測定データを用いたクラスター解析により表現型分類を可能にし、58 の Ca<sup>2+</sup>感受性変異株 (Ohnuki S ら(2007)) と温度感受性グルカン合成酵素変異株 (Okada H ら(2010)) を用いて表現型に類似性があると遺伝子機能も類似することを明らかにした。
- ② 形態プロファイリング法の開発: 形態に関する高次元表現型データから類似した表現型パターンを持つ変異株を統計的に探索する技法を開発し、薬剤の標的予想を可能にした (Ohnuki S ら(2010))。
- ③ 複雑な表現型情報のマイニング: 二回連続した主成分分析を行なうことで、疎構造で複雑な 501 次元表現型情報から単純か

つ独立な視点からの解析を可能にした (Ohnuki S ら(2011))。

## 2. 研究の目的

今まで研究代表者らは出芽酵母の細胞形態を主にして表現型を高次元で定量的に行うことにより、遺伝子欠損による表現型が似ていると遺伝子機能も類似することをゲノム規模で明らかにしてきた。本研究計画ではさらに超次元の拡張パラメータを作製し、遺伝子産物の局在位置・形態情報を定量化するシステムの構築を行なう。さらに高速化した表現型計測システムを導入することで、標的未知の薬剤について、標的予想を行い、形態プロファイリングによる標的予想システムの有用性を実証する。他のモデル生物でも類をみないこの野心的な試みは、細胞システム全体を視野に入れた動作原理の理解につながるだけでなく、機能未知遺伝子の機能の同定、遺伝子の新規機能の発見、薬剤の標的タンパク質の探索、醸造用酵母の育種などの研究で世界中の多くの研究者や産業界にとって有用な知的資産になる。

## 3. 研究の方法

酵母細胞内に局在する構造体のパターンは、「細胞の外形」、「粒子状」、「線状」、「領域を持った構造」、「細胞の一部」、「構造体の外形」、「ネットワーク構造」、「混合体」の 8 つに分けられる。そこでこれらについて幾何学的な見地から定量化できるパラメータを作成し、多くの人が解析利用できる詳細な定量表現型解析システムを構築する。

高速化した表現型計測システムの導入には、自動蛍光顕微鏡写真撮影システム (IN Cell Analyzer 2000) を使用し、標的未知の薬剤の標的予想については、以前我々が開発した形態プロファイリング法 (Ohnuki et al. 2010) を適用する。

## 4. 研究成果

### 4.1 超次元の拡張パラメータを使った解析

出芽酵母の細胞外郭 (細胞壁や細胞膜)、核 DNA 領域、アクチン、液胞、ミトコンドリア、微小管、微小管集合中心、セプチンリング、シスゴルジ、トランスゴルジ、オイル顆粒などからデジタル画像の抽出を行い、細胞構造体の定量解析を行える共通システムを構築した。

膜で囲まれたオルガネラは、必ず細胞内である領域を占めるが、光学顕微鏡の解像度が 0.2 μm であることから、画像中では酵母の小さな顆粒やオルガネラはほぼ点

として認識される。細胞骨格の場合には管ではなくて線として認識される。したがって、酵母の細胞内部のオルガネラの形状を「領域」、「点」、「線」のいずれかであると捉えることができた。

実際にオルガネラ画像を抽出する際には、画像抽出に使われるマセマティカル・モルフォロジーの一般的な手法全てが適応可能だった。画像中の細胞領域は、大津法などの二値化、セグメンテーションに必要な画像抽出法を使って行なった。その後芽の付け根部分を特定して、母細胞と娘細胞の部分に分割した。

液胞の酸性化は液胞加水分解酵素の活性の維持等に重要であり、液胞膜に存在しているプロトン輸送性 ATP 加水分解酵素 (V-ATPase) が中心的な役割を果たしている。本研究では、V-ATPase の活性を特異的に阻害するコンカナマイシン A (conCA) を用いて、酸性コンパートメントの酸性化を抑えた時に液胞タンパク質がどのように局在変化するのかを定量的に解析した。Huh ら (2003) が作成した GFP コレクションを用い、液胞もしくは液胞膜に局在している 73 個のタンパク質について、conCA 処理による局在変化を CalMorph を用いて定量的に解析したところ、19 個のタンパク質で局在変化が確認された。

#### 4.2 高速形態表現型計測システムの構築

出芽酵母の蛍光顕微鏡画像に基づく表現型情報を取得する作業は、(1) 細胞の培養、(2) 細胞の染色 (細胞壁、アクチン、細胞核) (3) 顕微鏡画像の取得、(4) 表現型パラメータ情報の取得、からなるが、(1) ~ (3) の部分については手作業によって行われてきた。その中でも特に顕微鏡画像の取得の部分さらなる高速化が必須条件だった。今回、自動蛍光顕微鏡写真撮影システム IN Cell Analyzer 2000 を使い、100% PBS/80% グリセロールを含む溶液中で観察することで、CalMorph で解析することが可能な良質の顕微鏡画像を取得することに成功した。繰り返し取得された画像定量情報と、これまでに既取得されている野生型 126 回分の情報を比較することで、自動化によって得られる画像情報の品質を検証した。

#### 4.3 バニリンの細胞内標的予想

近年、化石燃料の代替エネルギーとしてバイオエタノールが注目されている。特に廃材や農業残渣などの木質系バイオマスから糖化、発酵を経てエタノールを産生する技術は、未利用資源の有効活用という観

点から大きな期待を集めている。しかしながら木質系バイオマスを糖化した際に副産物として生じるアルコール発酵阻害物質が大きな問題となっており、酵母の生育や発酵を阻害するメカニズムの解明が強く求められていた。なかでもリグニンから生じるフェノール関連化合物であるバニリンがもっとも強い阻害効果を持つことが知られていたが、酵母におけるバニリンの標的と作用機作についてはわかっていなかった。

我々は、酵母の特徴の形態学的な分析からバニリンの標的を予想した。まず CalMorph 画像解析システムによって 501 の観点から酵母の形を解析した。次に統計学的に薬剤処理細胞と 4,718 株の出芽酵母の非必須遺伝子破壊株の形を Ohnuki らの方法 (2010) に従って比較した。形に基づくプロファイリングの結果、バニリン処理細胞はリボソーム大サブユニットの幾つかの欠損株と有意に類似していることが明らかになった。このことは、バニリンがリボソームの機能、つまりタンパク質合成を阻害していることを示唆している。実際に、ポリソーム解析でその予想を確認したところ、バニリンの標的が酵母のリボソームであることが分かり、バニリンの発酵阻害メカニズムが初めて明らかになった。

#### 4.4 新規抗真菌剤 Poacic acid の細胞内標的予想

ウィスコンシン大学の Jeff Piotrowski 研究員は、木質系バイオマスの主成分であるリグノセルロースの加水分解産物の中から、酵母を含む真菌の生育を強く阻害する桂皮酸誘導体を見つけ出し、それをポアシン酸と名付けていた。しかしながら、ポアシン酸が酵母の細胞内のどこに作用しているかはわかっていなかったために、形態情報に基づいた細胞内の標的を行うことにした。蛍光顕微鏡画像の画像解析システムを用いて、細胞の形に注目して、ポアシン酸を加えた出芽酵母の細胞と類似した遺伝子破壊株の細胞を探したところ、細胞壁を合成できなくなった幾つかの遺伝子破壊株の細胞とポアシン酸を加えた出芽酵母の細胞が顕著に類似していることが明らかになった。その後、実際にポアシン酸が出芽酵母の細胞壁の合成を阻害しているかを検証した。ポアシン酸は蛍光を発する物質だったが、ポアシン酸を出芽酵母の細胞に加えると細胞の外側にある細胞壁のグルカン層の部分に蛍光が認められ、細胞壁の主要な構成成分である  $\beta$ -1,3-グルカンがポアシン酸と結合していることが明らかになった。さらに出芽酵母の細胞

にポアシン酸を加えると、-1,3-グルカンが合成できなくなることになった。このことからポアシン酸は細胞壁のグルカン層に結合し、-1,3-グルカン合成を阻害する働きがあることが証明された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 20 件)

1. Tamura H, Okada H, Kume K, Goshima T, Nakamura R, Akao T, Shimoi H, Mizunuma M, Ohya Y, and Hirata D. Isolation of a spontaneous cerulenin-resistant sake yeast

with both high ethyl caproate-producing ability and normal checkpoint integrity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2015 Mar 19;1-9 査読有 DOI:10.1080/09168451.2015.1020756

2. Piotrowski J, Okada H, Lu F, Li S, Hinchman L, Ranjan A, Smith D, Higbee A, Ulbrich, A, Coon J, Deshpande R, Bukhman Y, McIlwain S, Ong I, Myers C, Boone C, Landick R, Ralph J, Kabbage M, and Ohya Y. The plant derived, antifungal agent poacic acid targets

-1,3-glucan. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Mar 112:E1490-1497 査読有 Doi:10.1073/pnas.1410400112

3. Koyano T, Konishi M, Martin SG, Ohya Y, Hirata D, Toda T, and Kume K. Casein kinase

1γ ensures monopolar growth polarity under incomplete DNA replication downstream

of Cds1 and calcineurin in fission yeast. *Mol Cell Biol.* 2015 May 1;35(9):1533-42 Epub 2015 Feb 17 査読有 Doi: 10.1128/MCB.01465-14

4. Okada H, Kono K, Neiman AM and Ohya Y. Examination and disruption of the cell wall.

*Cold Spring Harbor Protocols.* 2015 in Press 査読有

5. Ohnuki S, Okada H and Ohya Y. Image-based prediction of drug target in yeast.

*Chemical Biology - Methods and Protocols.* 2014 Dec 1263:319-327 査読有

Doi:10.1007/978-1-4939-2269-7\_24

6. Yang M, Ohnuki S, Ohya Y. Unveiling

nonessential gene deletions that confer significant morphological phenotypes beyond natural yeast strains. *BMC Genomics.*

2014 Oct 25;15:932 査読有 Doi:10.1186/1471-2164-15-932

7. Nogami S, Ohnuki S and Ohya Y. Hyperspectral imaging techniques for the characterization of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology.*

2014 Oct 50(5):939-947 査読有 DOI: 10.1111/jpy.12226

8. Okada H, Ohnuki S and Ohya Y. Quantification of cell, actin and nuclear DNA morphology with high-throughput microscope and CalMorph. *Cold Spring Harbor Protocols.* 2014 Apr 1;2015(4) 査読有 Doi: 10.1101/pdb.prot078667.

9. Ohnuki S, Enomoto K, Yoshimoto H and Ohya Y. Dynamic changes in brewing yeast

cells in culture revealed by statistical analyses of yeast morphological data.

*Journal of Bioscience and Bioengineering.* 2014 Mar 117(3):278-84 査読有

Doi:10.1016/j.jbiosc.2013.08.005

10. Okada H, Ohnuki S, Roncero C, Konopka JB, and Ohya Y. Distinct roles of cell wall biogenesis in yeast morphogenesis as revealed by multivariate analysis of

high-dimensional morphometric data. *Molecular Biology of the Cell.* 2014 Jan 25(2):222-33 査読有 Doi:10.1091/mbc.E13-07-0396

11. Nguyen TTM, Iwaki A, Ohya Y and Izawa S. Vanillin causes the activation of Yap1

and mitochondrial fragmentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 2014 Jan;117(1):33-8 査読有 Doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.06.008

12. 大矢 禎一 (2014) ビール酵母の発酵過程におけるビッグデータの活用. *バイオサイエンスとインダストリー.* 72:380-384 査読なし

13. 大矢 禎一、岡田 啓希、大貫 慎輔

(2014)バイオイメージング CalMorph:  
出

芽酵母細胞の画像解析システム. 画像ラボ.  
25:7-13 査読なし

14. Matsumoto R, Suzuki S and Ohya Y.  
Organelle acidification is important for  
localization of vacuolar proteins in  
Saccharomyces cerevisiae. Protoplasma  
2013 Dec 250:1283-1293. 査読有  
Doi:10.1007/s00709-013-0510-2

15. Ohnuki S, Nogami S, Ota S,  
Watanabe K, Kawano S and Ohya Y.  
Image-Based  
Monitoring System for Green Algal  
Haematococcus pluvialis  
(Chlorophyceae) Cells  
during Culture. Plant and Cell  
Physiology. 2013 Sep 54(11):1917-29.  
Epub 2013 Sep

20. 査読有 Doi: 10.1093/pcp/pct126

16. Yoshida M, Ohnuki S, Yashiroda Y  
and Ohya Y. Profilin is required for  
Ca<sup>2+</sup>  
homeostasis and Ca<sup>2+</sup>-modulated bud  
formation in yeast. Molecular Genetics  
and  
Genomics. 2013 Aug 288(7-8):317-28. 査  
読有 Doi:10.1007/s00438-013-0752-x

17. Yvert G, Ohnuki S, Nogami S,  
Imanaga Y, Fehrmann S, Schacherer J  
and Ohya Y.  
Single-cell phenomics reveals  
intra-species variation of phenotypic  
noise in yeast.  
BMC systems biology 2013 July 7(1):54  
査読有 Doi:10.1186/1752-0509-7-54

18. 大矢 禎一、木森義隆. (2013) 出芽  
酵母で広がる細胞の画像解析研究.  
映像情報メディア 67(9): 765-770 査読  
なし

19. Iwaki A, Ohnuki S, Suga Y, Izawa S  
and Ohya Y. Vanillin Inhibits  
Translation  
and Induces Messenger  
Ribonucleoprotein (mRNP) Granule  
Formation in Saccharomyces cerevisiae:  
Application and Validation of  
High-Content, Image-Based Profiling.  
PLoS ONE 2013 Apr 24;8(4):e61748 査  
読有 Doi:10.1371/journal.pone.0061748

20. Ohnuki S, Kobayashi T, Ogawa H,  
Kozono I, Ueda JY, Takagi M, Shin-Ya K,

Hirata

D, Nogami S and Ohya Y. Analysis of  
the biological activity of a novel  
24-membered macrolide JBIR-19 in  
Saccharomyces cerevisiae by the  
morphological imaging program  
CalMorph. FEMS Yeast Research 2012  
May 12(3):293-304. Epub 2012 Jan 3. 査  
読 有  
Doi:10.1111/j.1567-1364.2011.00770.x.

〔学会発表〕(計 27 件)

1. 大貫 慎輔他 出芽酵母必須遺伝子の半  
数以上はヘテロ破壊によりハプロ不全性  
を示す

2014.11.25-27 第 37 回日本分子生物学会  
年会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

2. 岡田啓希他 多変量な形態測定解析によ  
り明らかとなった細胞壁の新たな機能

2014.11.25-27 第 37 回日本分子生物学会  
年会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

3. Yoshikazu Ohya High-Resolution  
Phenotyping to Elucidate Essential  
Complex

Cellular Processes 2014.9.26 Yeast  
Phenome Meeting, New York University  
(New York,  
USA) (招待講演)

4. 吉田光範他 出芽酵母 Ca<sup>2+</sup>-cls 変異間  
の相互作用プロファイルを用いた Ca<sup>2+</sup>応  
答の再構築 2014.9.1-3 第 47 回酵母遺  
伝学フォーラム研究報告会、東京大学農学  
部弥生キャンパス・東京大学弥生講堂(東京  
都文京区)

5. 石井啓子他 出芽酵母の細胞壁合成チェ  
ックポイント制御因子の遺伝学解析  
2014.9.1-3

第 47 回酵母遺伝学フォーラム研究報告会、  
東京大学農学部弥生キャンパス・東京大学  
弥生講堂(東京都文京区)

6. 鈴木吾大他 温度感受性変異株の大規模  
な定量的表現型解析による必須遺伝子の  
機能探索

2014.9.1-3 第 47 回酵母遺伝学フォーラ  
ム研究報告会、東京大学農学部弥生キャン  
パス・東京大学弥生講堂(東京都文京区)

7. Yoshikazu Ohya Distinct roles of cell  
wall biogenesis in yeast morphogenesis  
2014.8.4-7 The 10th International  
Mycological Congress, Queen Sikitit  
National Convention Center (Bangkok,

Thai) (招待講演)

8.Hiroki Okada et al. The fourth function of the cell wall 2014.7.30-8.3 The 2014 Yeast Genetics Meeting, University of Washington (Seattle, USA)

9.Yoshikazu Ohya Imaging Analysis with CalMorph 2014. 4.13-18 The Workshop on the Systems Biology of Yeast and Fungi, The Sol Cayo Coco Hotel (Cayo Coco, CUBA)  
(招待講演)

10.Yoshikazu Ohya The cell wall contributes to phenotypic robustness in budding yeast 2013.12.14-18 The 2013 ASCB Annual Meeting, New Orleans Ernest N. Morial Convention Center (New Orleans, USA)  
(招待講演)

11.根岸孝寛他 出芽酵母におけるS期後期転写因子 Hcm1 を介した細胞壁合成チェックポイント制御機構 2013.12.3-6 第36回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド・神戸国際会議場 神戸国際展示場 (兵庫県神戸市)

12.吉田 光範他 Identification of chemical-genetic interaction based on high-dimensional morphological phenotypes 2013.12.3-6 第36回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド・神戸国際会議場 神戸国際展示場 (兵庫県神戸市)

13.岡田啓希他 多変量な形態測定解析により明らかとなった細胞壁の5番目の機能 2013.12.3-6 第36回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド・神戸国際会議場 神戸国際展示場 (兵庫県神戸市)

14.Yoshikazu Ohya High-Resolution Phenotyping to Elucidate Essential Complex Cellular Processes 2013.2.18-23 Omics Meets Cell Biology, Sagebrush Inn and Conference Center (Taos, New Mexico, USA) (招待講演)

15.大貫慎輔他 微細藻類の多機能画像解析ソフトウェア 2012.12.11-14 第35回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場・マリメッセ福岡 (福岡県福岡市)

16.岡田啓希他 出芽酵母の形態形成における細胞壁の各構成成分の役割 2012.12.11-14 第35回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場・マリメッセ福岡 (福岡県福岡市)

17.吉田 光範他 A link between Ca<sup>2+</sup> homeostasis and bud formation 2012.12.11-14 第35回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場・マリメッセ福岡 (福岡県福岡市)

18.Yoshikazu Ohya Image-based systems biology in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* 2012.08.21 ICSB The 13th International Conference on Systems Biology (招待講演) Toronto University (CANADA)

19.Yoshikazu Ohya Chemical-genetic analysis on the elucidation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae* 2012.6.8 5th International Conference on Molecular Mechanisms of Fungal Cell Wall Biogenesis (招待講演) Hotel Zora, Kravata Conference Hall (CROATIA)  
他8件

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称:細胞観察装置、細胞観察方法およびそのプログラム

発明者:大矢禎一、河野重行、野上識、大貫慎輔、大田修平、渡邊 光一

権利者:独立行政法人科学技術振興機構  
種類:特許

番号:特願 2012-259880 -  
PCT/JP2013-081894

出願年月日:2013年11月27日

国内外の別:国外

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://ps.k.u-tokyo.ac.jp/>

6.研究組織

(1)研究代表者

大矢 禎一 (OHYA YOSHIKAZU)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号:20183767